NU Science Journal 2010; 6(2): 173 - 181

การตรวจปริมาณฮีโมโกลบินเอทู เพื่อวินิจฉัยพาหะเบต้าธาลัสซีเมียด้วยเทคนิค Fast Protein Liquid Chromatography

จิรภาส จงจิตวิมล* อรทัย ตั้งวรสิทธิชัย สุรพล ตั้งวรสิทธิชัย
เกศินี เพ็งถาวร มะลิฉัตร ลิโป้ และสุวิทย์ ใจมั่น

Quantitative Hemoglobin A2 for Diagnosis of Beta-thalassemia Trait by Fast Protein Liquid Chromatography Technique

Jirapas Jongjitwimol*, Orathai Tangvarasittichai, Surapon Tangvarasittichai,
Keasinee Phengthaworn, Malichat Lipo and Suwit Chaimun

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000
*Corresponding author. E-mail: jirapasj@nu.ac.th

บทคัดย่อ

ธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางชนิดหนึ่งที่พบบ่อยในประเทศไทย สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมสู่ลูกหลานได้ การตรวจทางห้องปฏิบัติการจึงมีบทบาทสำคัญในการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมีย การศึกษานี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบินเอทู ด้วยวิธี Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) โดยใช้คอลัมน์ชนิด HiTrap™ Q HP วิเคราะห์ตัวอย่างเลือด 132 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับวิธี HPLC ซึ่งเป็นวิธีมาตราฐาน พบว่าที่เกณฑ์ของ HbA_2 5 ถึง 10% วิธี FPLC มีค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 100 ทั้งหมด โดยมีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ 0.986 ($r = 0.986$), P-value < 0.001 สรุปได้ว่าวิธี FPLC สามารถใช้วินิจฉัยพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: ฮีโมโกลบินเอทู พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย Fast Protein Liquid Chromatography

Abstract

Thalassemia is the most common genetic disease in Thailand. Its gene could be passed on to the offspring, so laboratory investigation plays an important role on control and prevention of severe thalassemia. This study performs a modified FPLC method with HiTrap^{TM} Q HP column for quantification of HbA_2. Then, 132 EDTA blood samples were analyzed by both FPLC and HPLC which is the standard method. 5-10 % HbA_2 concentration was the cut-off range of FPLC method that showed 100% of sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value for beta-thalassemia trait diagnosis. Moreover, the results of FPLC method were significantly correlated with those of HPLC ($r = 0.986$, $P<0.001$). In conclusion, FPLC method could effectively be used as a diagnosis method for beta-thalassemia trait

Keywords: hemoglobin A_2 (HbA_2), beta-thalassemia trait, Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

บทนำ

ธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางชนิดหนึ่งสามารถ่ายทอดทางพันธุกรรม เกิดจากความผิดปกติของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ฮีโมโกลบิน ส่งผลให้การสร้างสายโกลบินสายใดสายหนึ่งไม่ได้หรือได้ปริมาณน้อยลง (ผุสดี โตบันลือภพ, 2551) ทำให้สายโกลบินที่มีการสร้างปกติมีปริมาณเกินสมดุล ส่งผลให้เกิดความผิดปกติและแตกง่ายของเม็ดเลือดแดง ก่อให้เกิดอาการซีด เหลือง บางรายก่อให้เกิดตับโต ม้ามโต (อานนท์ บุญยะรัตเวช, 2535) พบบ่อยในประเทศไทย คือ α-thalassemia, β-thalassemia (ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี และคณะ, 2541; Winichagoon *et al*, 1988) ในภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทยมีความชุกของ α-thalassemia และ β-thalassemia ร้อยละ 20 และ 1.4 ตามลำดับ (Tangvarasittichai *et al*, 2005) นอกจากนี้ยังมีความผิดปกติในโครงสร้างของฮีโมโกลบิน เรียกว่า ฮีโมโกลบินผิดปกติ ชนิดที่พบบ่อยในประเทศไทย คือ ฮีโมโกลบินอี (HbE) มีความชุกประมาณร้อยละ 13 (ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี และคณะ, 2541) สำหรับภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีอุบัติการณ์สูงถึงร้อยละ 32-60 ภาคเหนือตอนล่างพบว่ามีอุบัติการณ์ร้อยละ 24.2 (Tangvarasittichai *et al*, 2005) ทั้งนี้ธาลัสซีเมียชนิดที่รุนแรงและอยู่ในแผนควบคุมและป้องกันโรคของประเทศไทย มี 3 ชนิดคือ Hb Bart's hydrops fetalis, Homozygous β-thalassemia และ β-thalassemia/HbE (ภัทราภรณ์ บุญขันธ์ และคณะ, 2551) จากการรายงานสถิติของกระทรวงสาธารณสุขมีความชุกของโรคธาลัสซีเมียประมาณ

600,000 รายหรือร้อยละ 1 ของประชากร ซึ่งความผิดปกติดังกล่าวก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสุขภาพ เศรษฐกิจ สังคม ต่อผู้ป่วยและครอบครัว ตลอดจนระบบเศรษฐกิจและสังคมของประเทศ (ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี และคณะ, 2541; ผุสดี โตบันลือภพ, 2551) ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ HbA_2 เพื่อวินิจฉัยผู้ที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย (β-thalassemia trait) จึงมีความสำคัญ คณะผู้วิจัยจึงสนใจพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ HbA_2 ด้วยเครื่อง FPLC: ÄKTA prime โดยใช้คอลัมน์ชนิด HiTrap™ Q HP โดยเปรียบเทียบกับปริมาณ HbA_2 ที่ได้จากเครื่อง High performance liquid chromatography : Bio-Rad

วิธี FPLC อาศัยการแลกเปลี่ยนไอออนชนิดไอออนลบ (anion-exchange) ในการแยกชนิดของฮีโมโกลบิน โดยในคอลัมน์บรรจุสารซึ่งสามารถจับ Hb ได้ เมื่อ pH สูงพอ แต่จับด้วยแรงที่แตกต่างกัน เมื่อผ่านคลอไรด์ไอออน (Cl^-) ให้มีความเข้มข้นสูงขึ้นอย่างช้าๆ ในคอลัมน์ Hb แต่ละชนิดจะถูกแย่งที่และถูกไล่ออกมาตามปริมาณประจุลบบนโมเลกุลจากน้อยไปมาก 1

เครื่องมือ อุปกรณ์ และวิธีวิจัย

1. ตัวอย่างเลือดที่ใช้ศึกษา

EDTA blood 132 ตัวอย่าง ซึ่งผ่านการตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและปริมาณของ Hb โดยใช้เครื่อง HPLC: Bio-Rad จากห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยโรคธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร

2. เครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

2.1) HPLC (Variant, Bio-Rad Laboratories, California, USA)

2.2) FPLC (ÄKTA prime, Amersham Biosciences, Sweden)

2.3) HiTrap™ Q HP column (GE Healthcare, Sweden)

2.4) pH meter (pH 900, Precisa, Switzerland)

3. วิธีการศึกษา

3.1) นำ hemolysate (50 µL EDTA blood ผสมใน 1 mL 0.05M Tris buffer pH 8.0) ผ่านเครื่อง FPLC โดยใช้คอลัมน์ชนิด HiTrap™ Q HP ขนาด 1 มิลลิลิตร โดยใช้ flow rate 3 mL/min

3.2) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นระหว่าง buffer A (0.05M Tris buffer pH 8.0) และ buffer B (buffer A:1M NaCl ratio เท่ากับ 1:1) ดังแสดงในตาราง 1 เป็นตัวแยก Hb ออกมาและถูกวัดปริมาณด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่นแสง 280 nm แสดงออกมาเป็น chromatogram

3.3) ใช้โปรแกรมคำนวณพื้นที่ใต้กราฟ และรายงานผลเป็นร้อยละของ HbA_2/E (%HbA_2/E)

ผลการศึกษา

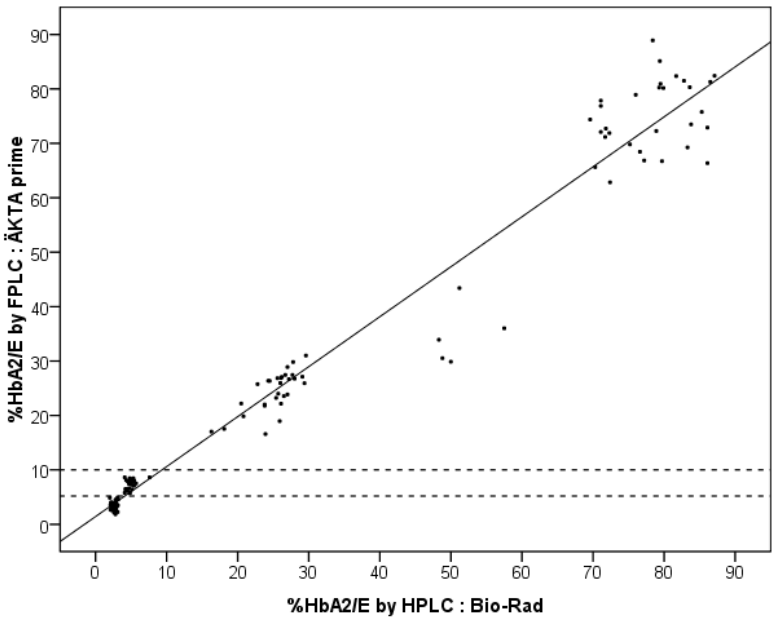
EDTA blood จำนวน 132 ตัวอย่าง ที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบินด้วยวิธี HPLC เป็นตัวอย่างเลือดคนปกติ (HbA_2 < 3.5%) 40 ราย, β-thalassemia trait (HbA_2 = 3.5-10%) 28 ราย, HbE trait (HbE = 10-40%) 29 ราย, β-thalassemia/HbE (HbE = 40-60%) 5 ราย และ homozygous HbE (HbE ≥ 60%) 30 ราย เมื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณ HbA_2 ด้วยเครื่อง FPLC ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ภายใน 8 นาที โดย retention time ของ HbA_2 และ HbE เท่ากับ 0.68 นาที เมื่อนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลการตรวจวิเคราะห์ที่ได้จากเครื่อง HPLC พบว่ามีค่าเฉลี่ยของร้อยละฮีโมโกลบินเอทู/อี (%HbA_2/E) ดังแสดงในตาราง 2 และเมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของ %HbA_2/E ระหว่างผลการตรวจวิเคราะห์ของทั้งสองวิธี (รูป 1) พบว่ามีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ 0.986 (r = 0.986), *P*-value < 0.001

ตาราง 1 อัตราส่วนระหว่าง Buffer A และ Buffer B

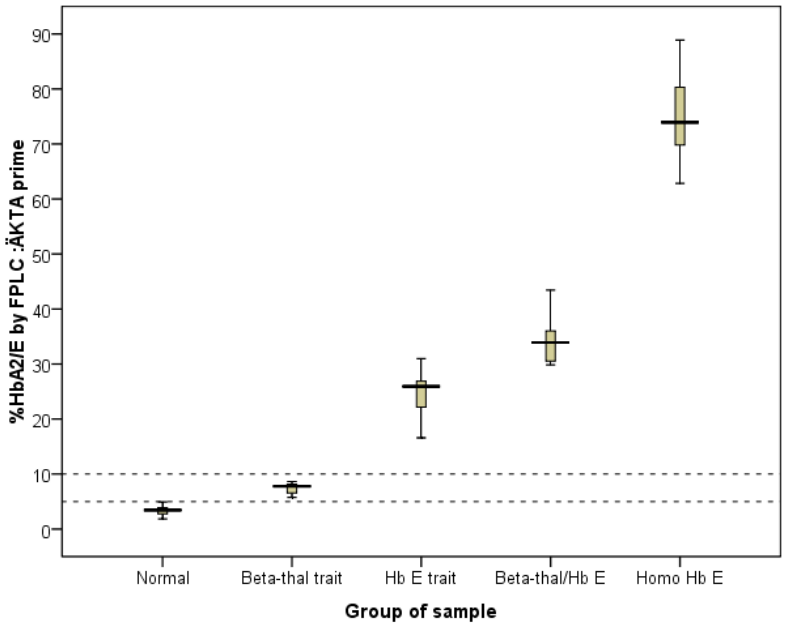
Volume (ml)	Buffer A (%)	Buffer B (%)
0	100	0
3.69	100	0
4.69	80	20
5.69	60	40
6.69	40	60
7.69	20	80
8.69	0	100
14.69	100	0

ตาราง 2 เปรียบเทียบปริมาณ Hb A_2/E ที่ได้จากวิธี HPLC และ FPLC ในแต่ละกลุ่ม

Sample group	Number (%) (n = 132)	Mean of %Hb A_2/E (SD)	
		HPLC	FPLC
Normal	40 (30.30)	2.62 (0.31)	3.38 (0.74)
β-thalassemia trait	28 (21.21)	4.98 (0.67)	7.44 (0.91)
Hb E trait	29 (21.97)	25.23 (3.14)	24.45 (3.79)
β-thalassemia/Hb E	5 (3.79)	51.16 (3.72)	34.75 (5.46)
homozygous Hb E	30 (22.73)	78.26 (5.60)	74.99 (6.52)



รูป 1 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของ %HbA_2/E ระหว่างวิธี HPLC กับ FPLC และ ค่า cut-off ของปริมาณ HbA_2 5 ถึง 10% เป็นเกณฑ์ในการตัดสินผู้ที่เป็น β-thalassemia trait



รูป 2 เปรียบเทียบการกระจายของ %HbA_2/E ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง และค่า cut-off ของปริมาณ HbA_2 5 ถึง 10% เป็นเกณฑ์ในการตัดสินผู้ที่เป็น β-thalassemia trait

ตาราง 3 จำนวนของผู้ที่เป็น β-thalassemia trait และ Non β-thalassemia trait ด้วยวิธี FPLC เปรียบเทียบกับวิธี HPLC โดยใช้ HbA_2 5 ถึง 10% เป็นเกณฑ์ในการตัดสินผู้ที่เป็น β-thalassemia trait

Method	**HPLC**	
	β-thalassemia trait	Non β-thalassemia trait
FPLC criteria :		
HbA_2 5-10%	28	0
HbA_2 < 5%, HbE > 10%	0	104

วิจารณ์และสรุปผล

วิธี FPLC เมื่อใช้คอลัมน์ชนิด HiTrap™ Q HP อาศัยหลักการการแลกเปลี่ยนประจุลบ ในการแยกชนิดของ Hb ทำให้ HbA_2 และ HbE ถูกแยกออกมาก่อน ซึ่งต่างวิธี HPLC ซึ่งใช้หลักการการแลกเปลี่ยนประจุบวก (Tangvarasittichai *et al*, 2009) โดย HbA_2 และ HbE สามารถแยกออกจากกันได้ยากด้วยเทคนิค FPLC และ HPLC เนื่องจาก Hb ทั้งสองชนิดจะถูกแยกออกมาใน retention time ที่ใกล้เคียงกันมาก (Joutovsky *et al*, 2004; Ou *et al*, 1993; Tangvarasittichai *et al*, 2009) แต่สามารถแยก HbA_2 และ HbE ออกจากกันได้โดยพิจารณาจากปริมาณของ HbA_2/E (Tangvarasittichai *et al*, 2009) สำหรับวิธี FPLC ที่คณะผู้วิจัยพัฒนาขึ้นมี retention time ของ Hb ทั้งสองชนิดเฉลี่ย (ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน) เท่ากับ 0.68 (0.14) นาที

จากตาราง 2 วิธี FPLC มีค่าเฉลี่ยของปริมาณ HbA_2 ในกลุ่ม β-thalassemia trait และ normal เท่ากับร้อยละ 7.44 และ 3.38 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่า HbA_2 ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC สำหรับกลุ่มผู้ที่เป็น HbE trait, β-thalassemia/HbE และ Homozygous HbE มีค่าเฉลี่ยของปริมาณ HbE เท่ากับร้อยละ 24.45, 34.75 และ 74.99 ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ประเด็นนี้เป็นข้อด้อยประการหนึ่งของวิธี FPLC แต่อย่างไรก็ตามค่า %HbA_2/E ของวิธี FPLC ที่สูงหรือต่ำกว่าค่าที่ได้จากวิธี HPLC ไม่ส่งผลต่อการแปลผล เนื่องจากวิธี FPLC ใช้เกณฑ์ในการแปลผลต่างจากวิธี HPLC กล่าวคือ วิธี FPLC เมื่อใช้ค่า cut-off ของปริมาณ HbA_2 ร้อยละ 5 ถึง 10 (รูป 1, 2) เป็นเกณฑ์ในการวินิจฉัย β-thalassemia trait (ตาราง 3) โดยพบว่ากลุ่มตัวอย่าง 28 ราย ที่เป็น β-thalassemia trait มีปริมาณ HbA_2 ร้อยละ 5-10 ทุกราย สำหรับกลุ่มที่ไม่เป็น β-thalassemia trait (non β-thalassemia trait) (n=104) ในงานวิจัยนี้หมายถึงกลุ่มที่มีปริมาณ HbA_2 น้อยกว่าร้อยละ 5 และกลุ่มที่มีปริมาณ HbE มากกว่าร้อยละ 10 พบว่ากลุ่ม normal (n=40) มี HbA_2 น้อยกว่าร้อยละ 5 ทุกรายและกลุ่มผู้ที่เป็น Hb E trait (n=29), β-thalassemia/Hb E (n=5) และ Homozygous Hb E (n=30) มีปริมาณ HbE มากว่าร้อยละ 10 ทุกราย (ตาราง 3) เมื่อใช้ค่า cut-off ดังกล่าวเป็นเกณฑ์ในการวินิจฉัย β-thalassemia trait (รูป 1, 2) พบว่าวิธี FPLC มีค่าความไว (Sensitivity), ความจำเพาะ (Specificity), ค่าทำนายผลบวก (PPV), ค่าทำนายผลลบ (NPV) และค่าประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์ (Efficiency) เท่ากับร้อยละ 100, 100, 100, 100 และ 100 ตามลำดับ เมื่อใช้สถิติ Chi-square วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างวิธี FPLC และ HPLC ซึ่งเป็นวิธีมาตราฐาน พบว่าทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (*P*-value = 1.000) นอกจากนี้พบว่าทั้งสองวิธีมีค่า Correlation coefficiency (r) เท่ากับ 0.986, *P*-value < 0.001 ผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับผลงานวิจัยในปี 2009 ของ Tangvarasittichai S. และคณะ โดยมีความแตกต่างกันในส่วนของ 1) ชนิดของคอลัมน์ที่ใช้ในการวิจัย 2) อัตราส่วนระหว่าง Buffer A และ Buffer B 3) ค่า cut-off ในการวินิจฉัย β-thalassemia trait และ 4)

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ระยะเวลาสั้นกว่า โดยใช้เวลาประมาณ 8 นาทีต่อการทดสอบ 1 รายเท่านั้น สำหรับข้อด้อยของวิธี FPLC คือวิธีนี้ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาค่อนข้างสูง ไม่เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการบางแห่งที่ไม่มีเครื่องนี้สำหรับการวิเคราะห์

งานวิจัยนี้ สรุปได้ว่าวิธี FPLC สามารถวินิจฉัย β-thalassemia trait ได้ และสามารถแยกกลุ่มคนปกติได้ดี โดยให้ผลการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพสูง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ บุคลากรของศูนย์ปฏิบัติการโรคธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดและข้อมูลในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี, มาลิดา พรพัฒน์กุล, ปราณี ฟู่เจริญ, สุพรรณ ฟู่เจริญ, ทัศนีย์ เล็บนาค. (2541). ธาลัสซีเมีย: คู่มือการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ. เครือข่ายงานธาลัสเซียเมียและมูลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทย กรุงเทพมหานคร, 90 หน้า

ผุสดี โตบันลือภพ. (2551). เปรียบเทียบการวัดปริมาณฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ โดยเทคนิค Microcolumn Chromatography กับวิธี Elution หลังแยกด้วย Cellulose Acetate Electrophoresis เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย. วารสารเทคนิคการแพทย์, *36*(1), 2258-2268.

ภัทราภรณ์ บุญขันท์, ศรินทร รักษ์มณี และ ธวัชชัย สุวรรณบรรณ. (2551). การศึกษาเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์เพื่อวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย โดยเครื่องมืออัตโนมัติ Capillary Zone Electrophoresis (CZE) และวิธี High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) ในโรงพยาบาลราชวิถี. วารสารเทคนิคการแพทย์, *36*(3), 2511-2520.

อานนท์ บุณยะรัตเวช. (2535). โลหิตวิทยา: เม็ดเลือดแดง. ฟันนี่พับบลิชชิ่ง กรุงเทพมหานคร, 340 หน้า

Joutovsky, A., Hadzi-Nesic, J. and Nardi, M. A. (2004). HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies: A study of 60,000 samples in a clinical diagnostic laboratory. *Clin Chem*, *50*(10), 1736-1747.

Ou, C. N. and Rognerud, C. L. (1993). Rapid analysis of hemoglobin variants by cation-exchange HPLC. *Clin Chem*, *39*(5), 820-824.

Tangvarasittichai, O., Sitthiworanan, C., Dechgitvigrom, W., Sanguansermsri, T. and Jeenapongsa, R. (2005). Prevalence and haematological parameters of thalassaemia in Lower Northern Thailand. *Haema*, *8*(2), 241-244.

Tangvarasittichai, S., Tangvarasittichai, O. and Jermnim, N. (2009). Comparison of fast protein liquid chromatography (FPLC) with HPLC, electrophoresis & microcolumn chromatography techniques for the diagnosis of β-thalassaemia. *Indian J Med Res*, *129*, 242-248.

Winichagoon, P., Thonglairuam, V., Fucharoen, S., Tanphaichitr, V. and Wasi, P. (1988). α-thalassemia in Thailand. *Hemoglobin*, *12*(5&6), 485-498.